

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K18763

研究課題名（和文）頭頸部癌血中循環腫瘍細胞の基礎的検討

研究課題名（英文）Basic research of circulating tumor cells in head and neck cancer

研究代表者

上野 貴雄（UENO, TAKAYOSHI）

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：30623649

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：頭頸部癌において、マイクロ流路チップを使用し、CTC、CTMの検出が可能であった。その表面抗原マーカーは多様で、原発巣の腫瘍細胞にヘテロ不均一性が存在するのと同様に、CTC、CTMにも様々な性質の腫瘍細胞が含まれていることが確認できた。CTMは、腫瘍細胞以外に白血球、血小板、血管内皮細胞などが付着した細胞で、Single CTCよりも生存能や遊走能、転移形成能が高いと考えられている。CTMの表面抗原マーカーを検討することで、より悪性度の高いCTCを同定する手がかりになると思われるが、その割合はCTC全体の数%で、多数の患者からCTCを回収し、CTMの表面抗原を検討する必要があると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果は、マイクロ流路チップにて頭頸部癌におけるCTCとCTMの検出が可能であること、またそのヘテロ不均一性を明らかにした。本研究で使用したマイクロ流路チップでは、7.5mlの血液からCTCは数個から数十個であり、CTMの割合はCTCの数%程度であることが判明した。今後、症例数を増やしてCTMの表面抗原マーカーを調べること、より悪性度の高いCTCを特徴づける表面抗原マーカーを同定できる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In head and neck cancer, CTC and CTM could be detected using microfluidic chips. The surface antigen markers were diverse, and it was confirmed that CTC and CTM contain tumor cells of various characteristics, just as there is heterogeneity in tumor cells in primary tumors. Although the surface antigen markers of CTM may provide clues to identify more malignant CTC, these markers account for only a few percent of all CTC, and it is necessary to collect CTC from a large number of patients and examine the surface antigens of CTM.

研究分野：頭頸部癌

キーワード：頭頸部癌

1. 研究開始当初の背景

血中循環腫瘍細胞 (Circulating tumor cell: CTC) は、がんの血行性転移に直接的に関与する細胞であるため、有用な臨床的情報を持つと考えられており、リキッドバイオプシーへの利用が期待されている。他のリキッドバイオプシーには血中循環腫瘍 DNA やエキソソーム、miRNA などがあるが、これらは癌組織全体像の把握にはよいが、CTCの方が癌の悪性度を鋭敏に反映すると考えられている。決定的に異なるのは、CTCが血管内部で生存可能な性質を持つ細胞であるという点である。そのため、CTCの解析は特に癌転移メカニズムの解明や予後診断、転移診断において強力なツールになりうる。それにもかかわらず核酸を指標とした研究が先行しているのはなぜか。それは以下のような CTC 解析の壁が存在することによる。

CTC 定量装置として唯一米国食品医薬局 FDA が認可したのは米国 Veridex 社の開発した EpCAM を表面に発現する細胞を CTC として検出する Cell Serach システムである。しかし、上皮間葉移行 (Epithelial Mesenchymal Transition; EMT) を生じた癌幹細胞形質を有する悪性度の高い CTC は細胞表面に EpCAM を発現していないため、質的解析における問題点を抱えている。肺癌などでは一定の評価を得たものの、頭頸部癌においては量的、質的評価がなされる前に日本から撤退している。この手法がうまくいかない理由として原発巣と同様に CTC の中にも不均一性が存在することが上げられる。原発巣から押し出された細胞や、血中へ出ることにはできるが EMT は進んでいない細胞、EMT の進行がすすんだ悪性度の高い細胞、癌幹細胞に近い性質を持つ細胞などである。抗体で CTC を補足するシステムを構築する場合は、遠隔転移を起こすような悪性度の高い CTC (生存能、浸潤能が高い細胞) に限定して選別できる抗体の検索が必要である。

2. 研究の目的

CTC の検出技術の発展により、血液中の CTC を検出し、計測することが可能となってきたが、一方で CTC 数データが必ずしも癌患者の病状や予後を反映しないことがわかってきた。PD-L1 や癌幹細胞マーカーの候補などの CTC 免疫染色にて、より予後への影響の大きい CTC を検出できる抗体の検索が行われているが難航しており、とくに頭頸部癌についてはほとんど研究が進んでいない。生きた CTC にて生存能、浸潤能の高い CTC を選別、解析することで、より効率的に悪性度の高い CTC の検出マーカーの候補の検討を行う必要がある。本研究の目的は、遠隔転移を有する頭頸部癌患者の血液から CTC を分離、生存能、浸潤能の高い CTC を選別し、その遺伝型、表現型を検討、より予後と相関する悪性度の高い CTC を効率的に検出するシステムの開発へとつなげるための基礎的研究である。

3. 研究の方法

上記の目的について検討するために以下の方法で研究を遂行した。

1) EpCAM 抗体とマイクロ流路デバイスを組み合わせたポリマー性マイクロチップ (ポリマー CTC チップ) による頭頸部癌患者 CTC 検出の検討。ポリマーチップ CTC にて、まずは頭頸部癌細胞株 OSC-19 を健常者血液に混ぜて CTC を回収し、DAPI+、CK+、CD45- の条件で検出することを確認したのちに、頭頸部癌患者 10 名にて CTC の検出を検討した。

2) ClearCellFX システム (マイクロ流路チップ) による頭頸部癌患者 CTC 検出と表面マーカーの検討。マイクロ流路チップにて CTC を回収し、DAPI+、CK+、CD45- の条件で検出し、蛍光顕微鏡にて各種表面マーカーを検討した。同様に、頭頸部癌細胞株 OSC-19 を健常者血液に混ぜて CTC を回収し、DAPI+、CK+、CD45- の条件で検出することを確認したのちに、頭頸部癌患者 18 名にて CTC の検出を行なった。

3) CTC における各種表面マーカーの検討

CTC が多数検出された症例において、CTC の回収、各種表面マーカーの免疫染色を行なった。抗体は、EMT 関連マーカー抗体 (抗 Vimentin, Fibronectin, N-cadherin 抗体) と癌幹細胞マーカー抗体 (抗 CD44v, CD133, CD271 抗体) を使用した。

4) CTM (Circulating Tumor microemboli) の検出

CTC の検出の過程で、複数の細胞が付着した細胞塊 (Circulating Tumor microemboli: CTM) を確認し、併せてカウントした。

5) CTC 培養と細胞周期の観察

回収した CTC を Cell-Clock Cell Cycle Assay Kit を使用して細胞周期を観察しながら、タイムラプス顕微鏡で経時的に観察した。

4. 研究成果

1) 頭頸部癌患者 10 名にて、EpCAM 抗体を吸着させたポリマー CTC チップによる CTC の回収を行なった。3 例で 7 個、3 個、1 個の CTC が検出されたが、残り 7 例では CTC が検出されなかった。回収効率が悪く、ClearCellFX システムによる CTC 回収に切り替えた。

2) 15 名中 14 例で 2-76 個の CTC を検出した。遠隔転移を有する症例ではいずれも CTC の

検出が可能であった。多くは一桁数の検出であったが、腫瘍量が多い一部の患者において CTC が多数検出された。治療前からの経時的にフォローが可能であった 1 症例では、治療前 2 4 個であったものが、治療開始 5 日に 2 個まで減少、その後 1 ヶ月、3 ヶ月と 4 個、3 個と CTC が検出されたが 2 年経過の現在も CR を維持している。

3) CTC における各表面マーカーの検討を行なった。CK⁻、Vimentin⁺ もしくは N-cadherin の細胞が少数だが観察された。幹細胞マーカーとしての CK⁻、CD44^{v+} の細胞が観察された。これらの結果は、CTC の不均一性を表していると考えられた。

4) CTC が多数検出された 3 症例にて、CTM が 0.5% から 4% の範囲 (1 - 3 個) にて検出された。

5) CTC の培養では、CTC 数の多い 3 症例で反復して最長 1 4 4 時間まで観察を行なったが、その分裂を確認することはできなかった。

頭頸部癌において、マイクロ流路チップを使用し、CTC (Circulating tumor cell)、CTM (Circulating Tumor microemboli) の検出が可能であった。その表面抗原マーカーは多様で原発巣の腫瘍細胞にヘテロ不均一性が存在するのと同様に、頭頸部腫瘍から血中へ侵入した細胞 (CTC) にも様々な性質の腫瘍細胞が含まれていることが確認できた。CTM は、腫瘍細胞以外に白血球、血小板、血管内皮細胞などが付着した細胞で、アポトーシスの一種であるアノイキスが抑制されていると報告されており、Single CTC よりも生存能や遊走能、転移形成能が高いと考えられている。CTM の表面抗原マーカーを検討することで、より悪性度の高い CTC を同定する手がかりになると思われる。しかしながら、その割合は CTC 全体の数% と考えられ、相当数の患者から CTC を回収し、CTM の表面抗原を検討する必要があると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kase Kina, Kondo Satoru, Wakisaka Naohiro, Dochi Hiroto, Mizokami Harue, Kobayashi Eiji, Kano Makoto, Komori Takeshi, Hirai Nobuyuki, Ueno Takayoshi, Nakanishi Yosuke, Hatano Miyako, Endo Kazuhira, Moriyama-Kita Makiko, Sugimoto Hisashi, Yoshizaki Tomokazu	4. 巻 9
2. 論文標題 Epstein-Barr Virus LMP1 Induces Soluble PD-L1 in Nasopharyngeal Carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 603 ~ 603
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/microorganisms9030603	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Endo Kazuhira, Ueno Takayoshi, Hirai Nobuyuki, Komori Takeshi, Nakanishi Yosuke, Kondo Satoru, Wakisaka Naohiro, Yoshizaki Tomokazu	4. 巻 132
2. 論文標題 In Response to <i>Low Skeletal Muscle Mass Is a Risk Factor for Aspiration Pneumonia</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Laryngoscope	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/lary.29792	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Makita Haruna, Endo Kazuhira, Kasahara Yoshiya, Nakata Asuka, Moriyama-Kita Makiko, Ishikawa Kazuya, Ueno Takayoshi, Nakanishi Yosuke, Kondo Satoru, Wakisaka Naohiro, Gotoh Noriko, Yoshizaki Tomokazu	4. 巻 21
2. 論文標題 Xenografts derived from patients with head and neck cancer recapitulate patient tumour properties	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2021.12646	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Endo Kazuhira, Ueno Takayoshi, Hirai Nobuyuki, Komori Takeshi, Nakanishi Yosuke, Kondo Satoru, Wakisaka Naohiro, Yoshizaki Tomokazu	4. 巻 131
2. 論文標題 Low Skeletal Muscle Mass Is a Risk Factor for Aspiration Pneumonia During Chemoradiotherapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Laryngoscope	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/lary.29165	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 上野貴雄
2. 発表標題 CTC濃縮回収装置ClearCell FXによる頭頸部癌CTCの検出
3. 学会等名 第5回CTC臨床応用研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 上野貴雄
2. 発表標題 頭頸部癌における血中循環腫瘍細胞の検出方法の開発
3. 学会等名 第120回日本耳鼻咽喉科学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------